

肝ミクロゾームアミターゼに関する研究

著者	諸井 佳代子
号	98
発行年	1974
URL	http://hdl.handle.net/10097/15510

氏 名 (本 籍) も る い か よ こ
諸 井 佳 代 子

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 第 9 8 号

学位授与年月日 昭 和 4 9 年 1 2 月 1 1 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 肝ミクロゾームアミターゼに関する研
究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 岡 野 定 輔 教 授 鶴 藤 丞

教 授 小 澤 光

論文内容要旨

緒言

薬物の代謝に関与する酵素系はその数が極めて多く、したがってそれらに関する研究は多岐にわたっている。肝ミクロゾームに局在しNADPHとO₂を要求する狭義の薬物代謝酵素に関する研究は、1955年頃よりB. B. Brodie一派により開始され今日ではその大部分が解明されつつある。しかし他の酵素群、中でも加水分解酵素（以下水解酵素と略記）に関してはその知見が比較的少く、生体に対する異物代謝を考える上で重要な課題として残されている。Krischらは1963年より主としてacetanilideを中心としたエステルまたはアミド結合をもつ化合物の代謝を中心に精力的な研究を進めている。それらの知見はアミダーゼまたはエステラーゼ研究に大きな貢献をしており、AugustinssonおよびAldridgeらのこの分野における先駆的研究に続くものである。1966年、Satoはヒドラジン系モノアミン酸化酵素（以下MAOと略記）阻害薬の一つであるisocarboxazid（以下ISOCと略記）の薬効が動物種、日令などにより著しく異なることに着目し、本薬物の代謝系に種差のあることを推定した。著者はこの点に興味を持ちISOCの代謝酵素（以下ISOCアミダーゼと略記）に関して生化学的薬理学の立場からこの問題を詳細に検討することとした。以下に、研究内容について論述する。

1. Benzyldiazine (BZH) の簡易定量法の検討

ISOCを基質とする代謝酵素の研究にはその主代謝産物であるBZHの定量法の検討が要求される。BZHの蛍光定量法はすでにRoth and Riederにより報告されているが、それは複雑な手法と特殊試薬を必要とするため必ずしもすべての目的に適しているとは言えない。そこで著者は次に述べる様な簡易でかつ高感度を示す方法を確立した。すなわち生体試料をメタリン酸で除蛋白後5%ジメチルアミノベンズアルデヒドアルコール溶液と氷酢酸の2:1 (v/v)混液を加え30分以上室温に放置後、490 nmで比色定量する。本法による定量限界は約2.44 μg/mlであり、これは蛍光法と大差がない。ラットの脳、肝、腎のホモジネートおよび血液に既知量のBZHを添加しその回収率を検討した所平均99.15%という満足すべき結果を得た。したがって本研究におけるBZHの定量はすべて本法により行った。

2. ISOCアミダーゼの種差、性差、日令差および酵素誘導剤の影響

標準インキュベーションメジウムは酵素標品1.0 ml, 基質 (ISOC, 3×10^{-3} M) 1.0 mlおよび0.2 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0) 1.0 mlを加えて37°C, 1時間インキュベートし生成したBZH量を測定することにより酵素活性を算出した。異なる動物種の酵素活性を比較した場合モルモット肝で最も高い活性を示し、以下家兎、ラット、マウスなどである。サル、ウシ、ブタな

どはラットと同程度かそれ以下である所から動物の大きさとは必ずしも並行しない。ラットの場合本アミダーゼは生後4日目までは酵素活性が全く検出されず、その後徐々に増加し60日目に達してほぼ一定値となる。また雄は一般に雌に比較して高い活性を有する。次に酵素誘導に関する知見から、ISOCアミダーゼはphenobarbital連続投与により活性が著しく増加するが、3-methylcholanthreneでは何の効果も示さない。ISOCアミダーゼは3種の合成ペニシリン剤をも水解するが、同様にprocaineも優れた基質となり得る。そこでISOCとprocaineの両者を比較検討した所、 K_m 値についてはISOCでは $0.13 \times 10^{-3} M$ 、procaineでは $0.53 \times 10^{-3} M$ であり、 V_{max} は前者で $17 \mu moles \text{ product} / mg \text{ protein} / 30 \text{ 分}$ であり後者は67である。さらに金属、各種阻害剤などによる影響も両者間で大差はなく、これら2種の物質は本酵素に対して極めて類似の性質を持っていることが認められた。さらにin vivoでphenobarbital前処置によるprocaineの代謝を検討した所、明らかに代謝酵素の誘導に基く代謝の促進がみられ、同時に測定したprocaineの代謝物であるパラアミノ安息香酸は明らかに増加した。逆にISOCアミダーゼの阻害剤であるEPNの前処置によりprocaineの代謝は顕著に抑制され、その結果代謝物は無処理群に比較し極めて低濃度にとどまった。

3. ISOCアミダーゼの精製と酵素化学的性質

モルモット肝ホモジネートから常法によりミクロゾームを分離しそれをさらにtrypsinにより可溶化した。次に硫酸分画、Sephadex G 25 およびDEAE Celluloseカラムを用いてNaCl溶液による連続密度勾配法により分離、精製した。以上の各段階を通じて最終的に得られた標品をポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて単一タンパクであることを確認した後、それについて酵素化学的諸性質を検索した。

a) 細胞内局在性はミクロゾーム画分に総活性の約87%が見出され、その他ミトコンドリア(9.000%, 10分)、リソゾーム(15.000%, 20分)、重ミクロゾーム(56.000%, 20分)などの各画分にも活性があった。これに対して上清画分には全く存在しなかった。

b) 阻害実験としては、一般に酵素反応阻害薬として知られている化合物を用いその作用を検討した。その結果p-chloromerwribenzoate (PCMB)、SKF 525-Aなどでは $1 \times 10^{-4} M$ で顕著な阻害が認められたが、EDTA、KCN、モノヨード酢酸などでは1 mMでさえ全く阻害がなかった。またグルタチオン、システイン、dithiothreitol (DTT)などの還元剤では特に活性化はみられなかったが、PCMBによる阻害はDTTの添加により回復した。これらの事実は本酵素がSH基を有することを示唆している。二価金属についてはHg、Znなどで顕著に阻害されたが賦活効果はいずれの場合においても見られなかった。

c) 安定性を種々の条件下で検討した所、 $-20^{\circ}C$ では約2ヶ月間活性の低下はみられず、加温することにより $45^{\circ}C$ までは一定値を保ち、それ以上では徐々に低下しながら $55^{\circ}C$ で完全に

失活する。

d) Andrews の方法に従い Sephadex G 200 を用いて分子量を推定した結果、 $210,000 \pm 10,000$ であった。

e) 4 種類の緩衝液を用い至適 pH を検討したところ、8.0-8.5 にそのピークが認められその際緩衝液間の差はみられなかった。また 20 種類以上のアミドはまたエステル結合をもつ化合物について基質特異性を検討した所、ISOC の他 phenethicillin, propicillin などの合成ペニシリンおよびペプチダーゼの合成基質の内アラニン、ロイシン、フェニルアラニンなどの β -ナフチルアミドが基質となり得た。

4. 妊娠ラットにおける ISOC の代謝と組織内モノアミン酸化酵素 (MAO) 活性ならびに胎児に対する毒性

ISOC の MAO 阻害効果は主として代謝物である BZH に基くことが知られている。ここでは第一に妊娠ラットにおける子宮、胎盤、肝および血漿中の MAO 活性の変動と観察した。その結果胎盤では 12 日目から 16 日目にわたり急速に活性が上昇しそれ以後は 22 日目までは一定となる。これに対して子宮では 8 日目以降減少し 16 日目から一定値を保つ。また ISOC アミダーゼは全期間を通じて大きな変動がみられない。次に妊娠 17 日目に ISOC を母体に投与し 24 時間にわたり組織内 BZH 量および MAO 活性を測定した所、肝、胎盤、子宮などでは 1-2 時間後に最高値を示し、その際羊水、胎児肝からも検出された。これは BZH が容易に血液-胎盤関門を通過して胎児へ移行することを示している。また ISOC 投与後 15-24 時間において母ラットが何ら異常を示さない状態でも胎児の大半は死亡した。これは明らかに MAO 活性の阻害と直接に関連があることを示すものである。

5. 有機リン化合物による ISOC アミダーゼの阻害

ある種のエステラーゼは有機リン系殺虫剤により強力に阻害されることが知られている。本アミダーゼについてもその阻害効果を peptidase, choline Sterase (ChE) などと比較検討した。例えば EPN 10 mg/Kg 投与により 60 分後に血液 ChE では約 30% の阻害にとどまったが、ISOC アミダーゼでは完全に阻害された。さらに低用量で試みた所、ChE では全く阻害がみられない 0.5 mg/Kg で ISOC アミダーゼ活性は対照の約 50% にまで減少した。また 0.5 mg/Kg の EPN を 3 日間連続投与し続く 4 日間にわたりその回復を観察した所、EPN 投与期間中は活性の低下が顕著であるが、中止により活性の回復が著るしい。並行して行ったアセトアニリドを基質とした場合は酵素活性の回復が極めて遅い。これらの知見は ISOC アミダーゼが ChE に比較し有機リン系殺虫剤に対して高感受性を有することを示すものである。他方、プラスチック工業で可塑剤として用いられている tricresyl phosphate に微量混在しているオルト異性体 (TOCP) は神経毒として広く知られている。本物質は 1 mg/Kg の低用量 (LD_{50} の約 $1/1000$) で

さえ ISOC アミダーゼを約 40% 阻害した。興味あることにこの種の阻害は雄が雌に比べ強力であることから、TOCP 代謝物がその本体であることが考えられ、事実それを裏付けるいくつかの知見が得られている。

結 論

以上述べた内容を要約すると次の様に結論づけることが出来る。すなわち肝ミクロゾーム、特に smooth-ER に主として存在するアミダーゼは薬物である ISOC、procaine の代謝に重要な役割を持っており、この水解酵素はエステラーゼおよびペプチダーゼ様作用をも有している。また膜結合性酵素として ER の integrity さを知る上で一つの指標となり得る。さらに酵素活性における著しい動物種差は本酵素により代謝される以来物質の薬効、毒性を推測する際大きな糸口を与えるものである。また phenobarbital で極めて強力に酵素誘導される事実は、臨床面で本薬物の中毒患者においてしばしばみられる procaine の局所麻酔効果の減弱という現象に解決を与えるものと考えてよい。他方、毒物学的観点から考察すると、本酵素は有機リン系殺虫剤に極めて高い感受性を有し、従来知られている ChE に比べはるかに高感度である。したがってこれらの農薬による中毒を予知する上で有用な手段となる。同様のことは今日広く用いられている tricresyl phosphate 中に微量混在するオルト異性体の毒性を検索する際にも応用することが出来る。最後に、ここで研究対象とした水解酵素は non-specific esterase の一種と考えられ、その種たる作用は体内構成成分よりはなしろ外来物質の代謝を司さざるためのものと推測される。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は薬物代謝酵素肝ミクロゾームアミダーゼについて生化学的薬理学の立場から検討したもので、大要下記の新知見を得ている。

1) 本アミダーゼは主としてミクロゾームに局在し、著しい種属差を有する。すなわち、モルモットで最大の活性が見出され、以下家忠、サル、ブタ、ラット、マウスの順である。また組織内分布を検討した結果、肝で最も多く、脾、腸、腎などがこれに続く。興味あることには血液中の酵素活性は極めて低く、脳には殆んど認められない。さらに本酵素は phenobarbital により強力な酵素誘導がかかるが、3-methylcholanthrene では全く無効である。

2) モルモットミクロゾームを材料として本酵素の精度を試みた所、その分子量は $210,000 \pm 10,000$ と推定され、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} などの金属により阻害される。標準基質として用いた isocarboxazid に対する K_m および V_{max} 値は各々 $2.1 \times 10^{-4} M$ および $3.6 \mu moles/ml/min$ である。またいかなる金属によっても賦活されることはない。

3) 本アミダーゼはある種の有機リン系殺虫剤により極めて強く阻害される。この事実はこの種の化合物の構造-活性相関を毒物学的立場から知る上で重要な示唆を与えるものである。また脱髄による神経障害 起物質として知られている tri-o-cresylphosphate は、本研究で試みたすべての阻害物質の中で最大の効果を示し、 LD_{50} 値の約 $1/1000$ で十分にその阻害がみられる。

4) プロカインの代謝に関与する血清水解酵素については今日まで多くの報告がある。しかし肝ミクロゾームアミダーゼによるものは比較的少く、本酵素を phenobarbital で誘導するかまたは逆に SKF 525-A を前処置することにより、プロカインの代謝速度が顕著に促進または遅延する。この事柄はプロカインのみならず類似構造をもつ他の局所麻酔薬においても容易に推測される所であり、臨床上その重要性を示唆している。

5) 本論文で研究対象とした水解酵素は、アミド結合のみならずエステル結合をも水解する性質をもつことから nonspecific esterase の範ちゅうに分類されるべきであり、この種の酵素は体内構成成分よりはむしろ異物の代謝をその目的としていると考えられる。

以上のとおり本研究は肝アミダーゼに関して多くの新知見を加えたもので、博士の学位を授与するに値すると認められる。